

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-171225

(43)Date of publication of application : 17.06.2003

(51)Int.Cl.

A61K 7/00

A61K 35/78

A61P 17/00

A61P 43/00

(21)Application number : 2001-366056

(71)Applicant : FANCL CORP

(22)Date of filing : 30.11.2001

(72)Inventor : MIYATA SATOSHI

(54) COMPOSITION FOR INTEGRIN $\alpha$ 6 $\beta$ 4 PRODUCTION PROMOTION

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a composition for integrin $\alpha$ 6 $\beta$ 4 production promotion for preventing, checking and ameliorating skin aging.

SOLUTION: This composition for integrin $\alpha$ 6 $\beta$ 4 production promotion comprises a plant of *Hedera helix* L., *Echinacea purpurea*, *Cucurbita pepo* L., *Taraxacum officinale* and *Angelica archangelica* L., or its extract.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 02.09.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 04.10.2005

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 2005-21087

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection] 02.11.2005

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-171225

(P2003-171225A)

(43) 公開日 平成15年6月17日 (2003.6.17)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

キーワード (参考)

A 6 1 K 7/00

A 6 1 K 7/00

K 4 C 0 8 3

N 4 C 0 8 3

35/78

35/78

M

N

S

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2001-366056 (P2001-366056)

(71) 出願人 593106918

株式会社ファンケル

神奈川県横浜市栄区飯島町109番地1

(22) 出願日

平成13年11月30日 (2001.11.30)

(72) 発明者 宮田 智

神奈川県横浜市戸塚区上品濃12番13号 株

式会社ファンケル中央研究所内

(74) 代理人 100090941

弁理士 藤野 清也 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インテグリン  $\alpha 6 \beta 4$  産生促進用組成物

(57) 【要約】

【課題】 皮膚の老化を予防、防止、改善するためのインテグリン  $\alpha 6 \beta 4$  産生促進用組成物を提供すること。

【解決手段】 セイヨウキズタ、エキナセア、カボチャ、セイヨウタンポポ、およびアンジェリカの植物またはその抽出物を含有させたインテグリン  $\alpha 6 \beta 4$  産生促進用組成物。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 セイヨウキズタ、エキナセア、カボチャ、セイヨウタンポポ、およびアンジェリカから選ばれる1種または2種以上の植物またはその抽出物を含有するインテグリン $\alpha 6 \beta 4$ 産生促進用組成物。

【請求項2】 セイヨウキズタ、エキナセア、カボチャ、セイヨウタンポポ、およびアンジェリカから選ばれる1種または2種以上の植物またはその抽出物を含有する光老化抑制用組成物。

【請求項3】 請求項1または2記載の組成物からなる皮膚外用剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、表皮基底細胞の細胞膜に存在し、表皮基底膜の構成成分であるラミニン5の受容体であるインテグリン $\alpha 6 \beta 4$ の産生を促進する植物またはその抽出物を含有する組成物、及びその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、しわ、くすみ、きめの消失、弾力性の低下など、皮膚の老化に伴って起こる変化には、加齢、日光曝露、環境によるストレス、精神的ストレスが関与していることが知られている。これらを皮膚内部のミクロの変化としてとらえると、真皮でのI型コラーゲン、III型コラーゲンおよびエラスチンなどの弾性繊維の減少や変性、基底膜の構成成分であるIV型コラーゲンやラミニンなどの減少や変性による基底膜の損傷、表皮細胞のターンオーバーの異常などが起こっている。

【0003】基底膜はIV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質により構成される緻密な膜で、表皮と真皮の結合部に存在する。基底膜は表皮と真皮の結合を担い、皮膚の構造維持に重要であるとともに、表皮のターンオーバーの制御や表皮と真皮の間の情報伝達に関与する。一方、老化した皮膚では基底膜の重複や偏平化が起こっていることから、基底膜の構造変化が皮膚老化を引き起こすと考えられている(Lavker, R. et al.: J. Invest. Dermatol., 73: 59-389, 1979, Lavker, R. et al.: Dermatol. Clin., 4: 379-389, 1986)。以上のようなことから、近年、老化による皮膚基底膜の損傷を予防、防止、改善する目的で、皮膚基底膜の構成成分であるラミニン5の産生を促進する成分を配合する組成物が開発されている(特開平11-343226, 特開2000-226308, 特願2000-331318, 特願2001-151485)。

【0004】表皮細胞が基底膜の構成成分であるIV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質に接着するためには、その受容体として働くインテグリンが必要不可欠である。インテ

グリンは $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖が非共有結合で会合するヘテロダイマーで、細胞膜に発現して、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどの細胞外のリガンドと結合するとともに、細胞内では、テーリンや $\alpha$ -アクチニンなどの細胞骨格タンパク質と結合し、細胞と細胞外マトリックスあるいは細胞と細胞の結合に関与する。現在、16種類の $\alpha$ 鎖、9種類の $\beta$ 鎖が報告されており、これら $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖の組み合わせにより、リガンド特異性の異なる多様な分子が形成されている。インテグリンは細胞接着を介して、細胞増殖、細胞分化、細胞運動、アポトーシス、形態形成、免疫反応、創傷治癒、血液凝固、骨吸収などの多岐にわたる生物学的機能を担っている(Hynes, R. O.: Cell, 69: 11-25, 1992, Rouslati, E. et al.: Cell, 77: 477-478, 1994)。

【0005】これまでに、ラミニンファミリーの一種であるラミニン5の受容体としてインテグリン $\alpha 6 \beta 4$ およびインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ が知られており、 $\alpha 6 \beta 4$ は主に細胞接着に関与し、 $\alpha 3 \beta 1$ は主に細胞の運動に関与することが知られている(Rouselle, P. et al.: J. Cell Biol., 114: 567-576, 1991, Verrando, P. et al.: Lab. Invest., 71: 567-574, 1994)。インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ は、分子量150kDの $\alpha 6$ 鎖と205kDの $\beta 4$ 鎖のダイマーで、 $\beta 4$ とダイマーを形成する $\alpha$ 鎖としては $\alpha 6$ のみが報告されている(Suzuki, S.: EMBO J., 9: 757-763, 1990)。インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ は、上皮細胞、シュワン細胞、神経細胞、一部の内皮細胞などで発現しており、皮膚では表皮基底細胞の基底側に存在し、基底膜に存在するラミニン5と結合して、表皮と基底膜間の結合を担っている(Rouselle, P. et al.: J. Cell Biol., 114: 567-576, 1991)。

【0006】インテグリン $\beta 4$ 遺伝子およびラミニン5遺伝子の変異は、表皮・真皮間の剥離と水泡形成を特徴とする重篤な遺伝的疾患である先天性接合部型表皮水泡症(Herlitz' s junctional epidermolysis bullosa)を引き起こすことから、インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ とラミニン5との接着が正常な皮膚構造の維持に必要な不可欠であることが明らかになっている(Aberdam, D. et al.: Nature Genet., 6: 299-304, 1994, Pulkkinen, L. et al.: Nature Genet., 6: 293-298, 1994, Vidal, F. et al.: Nature Genet., 10: 229-234, 1995)。また、インテグリン $\beta 4$ 遺伝子のノックアウトマウスは、先天性接合部型表皮水泡症と同様の表皮剥離がみられ、基底細胞がアポトーシスを起こしていることから、ラミニン

5とインテグリン $\alpha 6\beta 4$ の結合は基底細胞の生存に重要であることが知られている (Dawling, J. et al. : J. Cell Biol., 134:559-572, 1996)。

【0007】さらに、ラミニン5とインテグリン $\alpha 6\beta 4$ の結合は、細胞増殖シグナルに関与するRas-MA Pキナーゼの経路を介して、表皮細胞の増殖に関与することが知られている (Mainiero, F. et al. : EMBO J., 16:2365-2375, 1997, Mainiero, F. et al. : EMBO J., 17:3940-3951, 1998)。このように、インテグリン $\alpha 6\beta 4$ はラミニン5の受容体として、表皮と真皮の間の結合を担い、正常な皮膚構造の維持に重要であるとともに、表皮基底細胞の生存および増殖に重要な働きをする。

【0008】一方、老化に伴って表皮角化細胞のインテグリン $\beta 4$ の発現が低下することから、皮膚の老化とインテグリン $\alpha 6\beta 4$ の発現低下に因果関係があることが示唆されていた (Le Varlet B. et al. : J. Invest. Dermatol. Symposium Proceedings, 3:172-179, 1998)。したがって、表皮細胞におけるインテグリン $\alpha 6\beta 4$ の産生を促進し、老化による皮膚基底膜と基底細胞間の結合の低下を予防、防止、改善することにより、皮膚の老化を予防、防止、改善できることが予想されていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、これまでに表皮細胞におけるインテグリン $\alpha 6\beta 4$ の産生を促進して、表皮基底細胞とラミニン5との結合を促進することにより、皮膚の老化を予防、防止、改善することを目的とする組成物は開発されていない。したがって、本発明は皮膚の老化を予防、防止、改善するためのインテグリン $\alpha 6\beta 4$ 産生促進用組成物を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者は、種々の植物について表皮角化細胞におけるインテグリン $\alpha 6\beta 4$ の産生を促進する活性を検討した。その結果、セイヨウキズタ、エキナセア、カボチャ、セイヨウタンポポ、およびアンジェリカの植物がインテグリン $\alpha 6\beta 4$ の産生を有意に促進させることを見出し、本発明を完成した。

【0011】すなわち、本発明は、セイヨウキズタ、エキナセア、カボチャ、セイヨウタンポポ、およびアンジェリカから選ばれる1種または2種以上の植物またはその抽出物を含有するインテグリン $\alpha 6\beta 4$ の産生促進用組成物に関する。

【0012】本発明はまた、これらの植物またはその抽出物を含有する組成物を皮膚老化抑制用組成物、あるいは皮膚外用剤として用いることにも関する。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明に用いられるセイヨウキズタ (*Hedera helix* L.) は、ウコギ科ヘデラ属の植物である。ヨーロッパからコーカサス地方に原産する。抗癌剤、抗百日咳剤、鎮痛剤、消散剤として使用される。成分としては、サボニン、フラボノイド、有機酸などを含む。洗浄作用、抗炎症作用、瘦身作用があり、化粧品に広く使用される。特にニキビ、脂性肌用の洗顔料やクリーム、シャンプーなどに配合されている。

【0014】本発明に用いられるエキナセア (*Echinacea purpurea*, *E. angustifolia*, *E. pallida*) は、キク科エキナセア属の植物である。北アメリカ原産で、アメリカ先住民の間で万能薬として、歯痛、喉の痛み、風邪、伝染病などの治療に約400年前から利用されてきた。19世紀末、ヨーロッパにも紹介され、栽培が始まった。成分としては多糖、カフェ酸誘導体、アルキルアミドなどを含む。免疫力を高め、風邪や感染症、皮膚病の治療や予防、炎症に効果があると言われている (「薬用ハーブの機能研究」 健康産業新聞社)。

【0015】本発明に用いられるセイヨウタンポポ (*Taraxacum officinale*) は、キク科タンポポ属の植物である。東ヨーロッパ原産で、葉は生でサラダとして、煎った根はコーヒーの代替として、花はワインの原料として用いられる。成分としてはトリテルペン、ステロール、糖類、ビタミン類、カリウムを含む。根は消化不良や便秘に効果があり、また、肝臓と胆嚢を刺激し、胆汁の分泌を増加させ、肝障害や黄疸に有効である。葉は強力な利尿作用があり、また、血液や組織の浄化作用もあり、皮膚病やリウマチの治療薬としても有効である (「ハーブ大全」 小学館)。

【0016】本発明に用いられるアンジェリカ (*Angelica archangelica* L.) は、セリ科シシウド属の植物である。成分としては、アンゲリカラクトン、アンゲリシン、アンゲリカ酸、ベルガアテンや葉酸、ビタミンB12などのビタミンB群などを含む。血行を良くし、女性ホルモンの分泌を調整する効用があり、貧血症、生理痛、生理不順、冷え性などに広く用いられる (「機能性ハーブの生理活性」 常盤植物化学研究所)。

【0017】本発明に用いられるカボチャ (*Cucurbita pepo* L.) は、ウリ科カボチャ属の植物である。北アメリカ原産で、野菜としてなじみが深く、世界中で栽培されている。種子は栄養価が高く、食用にされる。成分としては、脂肪酸、リグナン、トコフェロール、微量元素であるセレンなどが含まれている。ヨーロッパでは、種子の油性の抽出物が過敏膀胱や初期の前立腺肥大症などの泌尿器系疾患の治療目的に用いられている (「機能性ハーブの生理活性」 常盤植物化学研究所)。

【0018】本発明における植物は、葉、茎、芽、花、木質部、木皮部 (樹皮) などの地上部、根、塊茎などの地下部、種子、樹脂などのすべての部位が使用可能であ

る。本発明における植物は、それら自体を乾燥させた乾燥物、その粉砕物、それら自体を圧搾抽出することにより得られる搾汁、植物自体あるいはその乾燥物の水またはアルコール、エーテル、アセトンなどの有機溶媒による粗抽出物および粗抽出物を分配、カラムクロマトグラフィーなどの各種クロマトグラフィーなどで段階的に精製して得られた抽出物画分などのすべてを含むが、植物自体の有機溶媒抽出物が好ましく、アルコール抽出物が特に好ましい。これらは単独で用いても良く、2種以上混合して用いても良い。

【0019】本発明における植物の組成物への有効配合量は、植物の調製法、製剤の形態などにより、適宜選択、決定され、特に限定されないが、例えば、本発明の植物の乾燥粉砕物からアルコール、エーテル、アセトンなどの有機溶媒により抽出された抽出物を調製物として使用する場合は、その乾燥重量として0.001〜30重量%が適当である。

【0020】セイヨウキズタ、エキナセア、カボチャ、セイヨウタンポポ、アンジェリカの植物またはその抽出物を含む本発明組成物は、インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ の産生を促進し、基底細胞の活性化、再生促進に有用であり、紫外線の照射により低下した基底細胞の働きを高めて、基底膜と基底細胞の結合力を強化するので、皮膚などの光老化を抑制するのみでなく、光老化の再生作用も有する。

【0021】本発明の組成物には、植物油のような油脂類、高級脂肪酸、高級アルコール、シリコン、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン界面活性剤、防腐剤、糖類、金属イオン封鎖剤、水溶性高分子のような高分子、増粘剤、粉体成分、紫外線吸収剤、紫外線遮断剤、ヒアルロン酸のような保湿剤、香料、pH調整剤、乾燥剤等を含有させることができる。ビタミン類、皮膚賦活剤、血行促進剤、常在菌コントロール剤、活性酸素消去剤、炎症剤、抗癌剤、美白剤、殺菌剤等の他の薬効成分、生理活性成分を含有させることもできる。

【0022】油脂類としては、例えばツバキ油、月見草油、マカデミアナッツ油、オリーブ油、ナタネ油、トウモロコシ油、ゴマ油、ホホバ油、胚芽油、小麦胚芽油、トリオクタン酸グリセリン、等の液体油脂、カカオ脂、ヤシ油、硬化ヤシ油、パーム油、パーム核油、モクロウ、モクロウ核油、硬化油、硬化ヒマシ油等の固体油脂、ミツロウ、キャンデリラロウ、綿ロウ、ヌカロウ、ラノリン、酢酸ラノリン、液状ラノリン、サトウキビロウ等のロウ類が挙げられる。

【0023】炭化水素類としては、流動パラフィン、スクワレン、スクワラン、マイクロクリスタリンワックス等が挙げられる。

【0024】高級脂肪酸としては、例えばラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン

酸、リノール酸、リノレン酸、ドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)等が挙げられる。

【0025】高級アルコールとして、例えば、ラウリルアルコール、ステアリルアルコール、セチルアルコール、セトステアリルアルコール等の直鎖アルコール、モノステアリルグリセリンエーテル、ラノリンアルコール、コレステロール、フィトステロール、オクチルドデカノール等の分枝鎖アルコール等が挙げられる。

【0026】シリコンとして、例えば、鎖状ポリシロキサン、ジメチルポリシロキサン、メチルフェニルポリシロキサン等、環状ポリシロキサンのデカメチルシクロペンタシロキサン等が挙げられる。

【0027】アニオン界面活性剤として、例えば、ラウリン酸ナトリウム等の脂肪酸塩、ラウリル硫酸ナトリウム等の高級アルキル硫酸エステル塩、POEラウリル硫酸トリエタノールアミン等のアルキルエーテル硫酸エステル塩、N-アシルサルコシン酸、スルホコハク酸塩、N-アシルアミノ酸塩等が挙げられる。

【0028】カチオン界面活性剤として、例えば、塩化ステアリルトリメチルアンモニウム等のアルキルトリメチルアンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム等が挙げられる。

【0029】両性界面活性剤として、アルキルベタイン、アミドベタイン等のベタイン系界面活性剤等が挙げられる。

【0030】非イオン界面活性剤として、例えば、ソルビタンモノオレエート等のソルビタン脂肪酸エステル類、硬化ヒマシ油誘導体が挙げられる。

【0031】防腐剤として、例えばメチルパラベン、エチルパラベン等を挙げることができる。金属イオン封鎖剤として、例えばエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、エデト酸、エデト酸ナトリウム塩等のエデト酸塩を挙げることができる。

【0032】高分子として、例えば、アラビアゴム、トラガカントガム、ガラクトン、グアーガム、カラギーナン、ペクチン、寒天、クインスード、デキストラン、プルランカルボキシメチルデンブ、コラーゲン、カゼイン、ゼラチンメチルセルロース、メチルヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)、アルギン酸ナトリウムカルボキシビニルポリマー(CARBO POL等)等のビニル系高分子、等を挙げることができる。

【0033】増粘剤として、カラギーナン、トラガカントガム、クインスード、カゼイン、デキストリン、ゼラチン、CMC、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースカルボキシビニルポリマー、グアーガム、キサンタンガム、ベントナイト等を挙げることができる。

【0034】粉末成分としては、タルク、カオリン、雲母、シリカ、ゼオライト、ポリエチレン粉末、ポリスチレン粉末、セルロース粉末、無機白色顔料、無機赤色系顔料、酸化チタンコーテッドマイカ、酸化チタンコーテッドタルク、着色酸化チタンコーテッドマイカ等のパール顔料、赤色201号、赤色202号等の有機顔料を挙げることができる。

【0035】紫外線吸収剤としては、パラアミノ安息香酸、サリチル酸フェニル、パラメトキシケイ皮酸イソプロピル、パラメトキシケイ皮酸オクチル、2,4-ジヒドロキシベンゾフェノン、等を挙げることができる。紫外線遮断剤として、酸化チタン、タルク、カルミン、ベントナイト、カオリン、酸化亜鉛等を挙げることができる。

【0036】保湿剤として、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、1,2-ペンタンジオール、グリセリン、ジグリセリン、ポリグリセリン、キシリトール、マルチトール、マルトース、ソルビトール、ブドウ糖、果糖、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、ピロリドンカルボン酸、シクロデキストリン等が挙げられる。

【0037】薬効成分としては、ビタミンA油、レチノール等のビタミンA類、リボフラビン等のビタミンB<sub>2</sub>類、ピリドキシン塩酸塩等のB<sub>6</sub>類、L-アスコルビン酸、L-アスコルビン酸リン酸エステル、L-アスコルビン酸モノパルミチン酸エステル、L-アスコルビン酸ジパルミチン酸エステル、L-アスコルビン酸-2-グルコシド等のビタミンC類、パントテン酸カルシウム等のパントテン酸類、ビタミンD<sub>2</sub>、コレカルシフェロール等のビタミンD類； $\alpha$ -トコフェロール、酢酸トコフェロール、ニコチン酸D- $\alpha$ -トコフェロール等のビタミンE類等のビタミン類を挙げることができる。アラセナエキス、グルタチオン、ユキノシタ抽出物等の美白剤、ローヤルゼリー、ブナノキエキス等の皮膚賦活剤、カプサイシン、ジンゲロン、カンタリスチンキ、イクタモール、カフェイン、タンニン酸、 $\gamma$ -オリザノール等の血行促進剤、グリチルリチン酸誘導体、グリチルレチン酸誘導体、アズレン等の消炎剤、アルギニン、セリン、ロイシン、トリプトファン等のアミノ酸類、常在菌コントロール剤のマルトースシロ糖縮合物、塩化リゾチーム等を挙げることができる。

【0038】さらに、カミツレエキス、パセリエクス、ブナノキエキス、ワイン酵母エキス、グレープフルーツエキス、スイカズラエキス、コメエキス、ブドウエキス、ホップエキス、コメヌカエキス、ビワエキス、オウバクエキス、ヨクイニンエキス、センブリエキス、メリロートエキス、バーチエキス、カンゾウエキス、シャクヤクエキス、サボンソウエキス、ヘチマエキス、トウガラシエキス、レモンエキス、ゲンチアナエキス、シソエ

キス、アロエエキス、ローズマリーエキス、セージエキス、タイムエキス、茶エキス、海藻エキス、キューカンバーエキス、チョウジエキス、ニンジンエキス、マロニエエキス、ハマメリスエキス、クワエキス等の各種抽出物を挙げることができる。

【0039】本発明の組成物は、例えば水溶液、油剤、乳液、懸濁液等の液剤、ゲル、クリーム等の半固形剤、粉末、顆粒、カプセル、マイクロカプセル、固形等の固形剤の形態で適用可能である。従来から公知の方法でこれらの形態に調製し、ローション剤、乳剤、ゲル剤、クリーム剤、軟膏、硬膏、ハップ剤、エアゾール剤、坐剤、注射剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤、丸剤、シロップ剤、トローチ剤等の種々の剤型とすることができる。これらを身体に塗布、貼付、噴霧、飲用等により適用することができる。特にこれら剤型の中で、ローション剤、乳剤、クリーム剤、軟膏剤、硬膏剤、ハップ剤、エアゾール剤等が皮膚外用剤に適している。化粧料としては、化粧水、乳液、クリーム、パック等の皮膚化粧料、メイクアップベースローション、メイクアップクリーム、乳液状又はクリーム状あるいは軟膏型のファンデーション、口紅、アイカラー、チークカラーといったメイクアップ化粧料、ハンドクリーム、レッグクリーム、ボディローション等の身体用化粧料等、入浴剤、口腔化粧料、毛髪化粧料とすることができる。

【0040】

【実施例】次に、実施例及び比較例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

〔植物抽出液の調製〕セイヨウキズタ (*Hedera helix* L.) の葉、エキナセアプルプレア (*Echinacea purpurea* L. Moench) の根、薬用カボチャ (*Cucurbita pepo* L.) の種子、セイヨウタンポポ (*Taraxacum officinale* G.) の根、アンジェリカ (*Angelica archangelica* L.) の根、セイヨウイラクサ (*Urtica dioica* L.) の根、ゲンチアナ (*Gentiana lutea* L.) の根を細切し、その各1kgに99.5%エタノール3Lを加え、室温で一晩浸漬した。これを濾過し、各抽出液を得た。なお、ここで、セイヨウイラクサ (*Urtica dioica* L.) 及びゲンチアナ (*Gentiana lutea* L.) の抽出液は、比較対照のために調製した。各抽出液を濃縮したところ、その蒸発残分はそれぞれ65g、23g、135g、45g、78g、56g、43gであった。

【0041】〔正常ヒト表皮角化細胞の培養〕胎児由来正常ヒト表皮角化細胞；NHEK (旭テクノグラス) を表皮角化細胞用培地；KGM (旭テクノグラス) で37℃-5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養した。KGMは、表皮角化細胞基礎培地にヒト上皮細胞増殖因子 (0.1ng/ml)、インシュリン (5.0μg/ml)、ハイドロコルチゾン (0.5μg/ml)、ゲンタマイシン (50μg/ml)、アンフォテリシンB

(50  $\mu$ g/ml)、牛脳下垂体抽出液(2 ml)を添加したものである。本実験には継代数が3~5代の細胞を使用した。

【0042】[RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction) による各植物抽出液のインテグリン $\alpha$ 6 $\beta$ 4産生促進活性の測定] NHEKをKGMで $1.25 \times 10^5$ /mlとなるように懸濁し、4 ml/ウェルで6穴プレートに播種し、24時間培養した。前記の方法により調製した各植物抽出液およびウシ胎児血清(FBS)を添加したKGMを4 ml/ウェルで処理し、さらに24時間培養した。培養後、TRIzol試薬(ライフテックオリエンタル)を用いて、プロトコールに従い全RNAを回収した。ウシ胎児血清(FBS)は、インテグリン $\alpha$ 6 mRNAおよびインテグリン $\beta$ 4 mRNAの発現を促進する因子として公知の物質であり、ここでは対照として用いた。

【0043】回収した全RNAを用いて、RT-PCR high (東洋紡)により、インテグリン $\alpha$ 6 mRNA、インテグリン $\beta$ 4 mRNAおよびG3PDH mRNAの発現促進活性を測定した。G3PDH遺伝子はハウスキーピング遺伝子として知られ、全ての細胞で恒常的に発現していることから、コントロール遺伝子として広く用いられている。PCR用プライマーとして、インテグリン $\alpha$ 6は5'-GAA CTG TGT GAA CAT CAG A-3'および5'-ATC CTTACA GCA TGG TAT CG-3'を用い、インテグリン $\beta$ 4は5'-CGG ATG CTG CTT ATT GAG AAC-3'および5'-GAG GGT GGA GGA TGT GCT TAG-3'を用い、G3PDHは5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'および5'-TCC ACCACC CTG TTG CTG TA-3'を用いた。PCRの反応条件は、インテグリン $\alpha$ 6およびインテグリン $\beta$ 4が、94℃、7分処理後、94℃、1分、56℃、1分、74℃、1分を25回繰り返した後、74℃、10分処理し、4℃で保存した。一方、G3PDHは、94℃、7分処理後、94℃、1分、58℃、1分、74℃、1分を20回繰り返した後、74℃、10分処理し、4℃で保存した。RT-PCR産物を電気泳動後、エチジウムブロマイドにより染色し、写真撮影した。

【0044】各植物抽出液を0.1%で処理した時の結果を図1に示す。ここで植物抽出液を0.1%で処理するとは、固形分濃度にして0.1重量%になるように、エタノールで100 mg/mlに調整した植物抽出液を培地量の1重量%加えて処理することをいう。セイヨウキズタの葉、エキナセアブルブレアの根、薬用カボチャの種子、セイヨウタンポポの根、アンジェリカの根の各抽出液で処理した場合は、無処理対照に比べてインテグリン $\alpha$ 6 mRNAおよびインテグリン $\beta$ 4 mRNAの発

現が有意に促進された。一方、セイヨウイラクサの根、ゲンチアナの根の抽出液で処理した場合は、インテグリン $\alpha$ 6 mRNAおよびインテグリン $\beta$ 4 mRNAの発現に対する促進活性は見られなかった。尚、G3PDHの発現は植物抽出液の処理の有無に関わらず、同程度であった。このことから、本発明のセイヨウキズタ、エキナセア、カボチャ、セイヨウタンポポ、およびアンジェリカがインテグリン $\alpha$ 6 $\beta$ 4産生促進のために選択的に作用することが分かった。

【0045】セイヨウキズタの葉の抽出液を濃度を変えて処理した時の結果を図2に示す。図2における濃度も、前記と同じで、培地量に対する固形分濃度を表わす。セイヨウキズタの葉の抽出液処理により、濃度依存的にインテグリン $\alpha$ 6 mRNAおよびインテグリン $\beta$ 4 mRNAの発現が促進された。また、セイヨウキズタの葉の抽出液を0.1%及び1.0%で処理した場合、FBSを0.1%及び1.0%で処理した場合と同程度の活性が見られた。尚、G3PDHの発現は植物抽出液の処理の有無に関わらず、同程度であった。

【0046】[各植物抽出液の光障害抑制効果の測定] NHEKをKGMで $2 \times 10^5$ /mlとなるように懸濁し、各植物抽出液およびインテグリン $\alpha$ 6 mRNAおよびインテグリン $\beta$ 4 mRNAの発現を促進する因子であるウシ胎児血清(FBS)で処理した。この懸濁液を1 ml/ウェルで24穴プレートに播種し、24時間培養した。その後、培養液を廃棄し、細胞をPBS(-)で洗浄後、再度PBS(-)を添加し、プレートに蓋をしない状態で紫外線を70 mJ/cm<sup>2</sup>で照射した。対照として、紫外線を照射しない群の細胞も作製した。さらに24時間培養後、PBS(-)で洗浄し、浮遊細胞を除去した後、5%グルタルアルデヒド水溶液を室温、15分間処理し、細胞を固定した。水道水にて洗浄し、ドライヤーで乾燥後、蛍光染色液(5  $\mu$ g/mlのHochst 33342 (Sigma-Aldrich Co.)および0.001%のポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(和光純薬)を含む水溶液)を室温、暗所にて1.5時間処理した。水道水にて洗浄し、ドライヤーで乾燥後、蛍光プレートリーダーにより、蛍光強度を測定し、細胞生存率を算出した。

【0047】各植物抽出液を0.1%で処理した時の結果を表1に示す。本実験での細胞生存率は、植物抽出液を無処理で、紫外線を非照射の場合を100%として表した。紫外線非照射の場合は、各植物抽出液の処理の有無に関わらず、同程度の細胞生存率であった。一方、紫外線を70 mJ/cm<sup>2</sup>で照射した場合は、無処理の時の細胞生存率が約55%であったのに対して、セイヨウキズタ、エキナセア、カボチャ、セイヨウタンポポ、およびアンジェリカの植物抽出液を処理した場合は有意に細胞生存率が増加した。一方、セイヨウイラクサの根、ゲンチアナの根の各抽出液を処理した場合は、細胞生存

率の増加は見られなかった。

【0048】セイヨウキズタの葉の抽出液を濃度を変えて処理した時の結果を表2に示す。セイヨウキズタの葉

の抽出液は、濃度依存的に細胞生存率を増加させた。

【0049】

【表1】

インテグリンα6β4産生促進剤による表皮角化細胞の光障害抑制効果

薬剤名 (0.1%)	紫外線照射量 (mJ/cm <sup>2</sup> )	細胞生存率 (%) 平均値±標準偏差
無処理 (対照)	0	100.0±1.6
セイヨウキズタ	0	97.2±1.0
エキナセア	0	97.8±0.8
セイヨウレボダ	0	98.6±3.6
セイヨウタンポポ	0	97.4±2.5
アンジェリカ	0	100.4±3.7
セイヨウイラクサ (対照)	0	101.2±2.3
ゲンチアナ (対照)	0	99.1±1.7
無処理 (対照)	70	55.2±1.5
セイヨウキズタ	70	63.5±2.2
エキナセア	70	65.4±2.0
セイヨウレボダ	70	61.1±1.5
セイヨウタンポポ	70	62.0±4.2
アンジェリカ	70	63.4±1.3
セイヨウイラクサ (対照)	70	53.9±1.8
ゲンチアナ (対照)	70	54.6±1.6

【0050】

【表2】

セイヨウキズタ抽出液の濃度変化における表皮角化細胞の光障害抑制効果

薬剤名	紫外線照射量 (mJ/cm <sup>2</sup> )	細胞生存率 (%) 平均値±標準偏差
無処理 (対照)	0	100.0±1.9
FBS 0.1% (対照)	0	111.2±1.1
FBS 1.0% (対照)	0	126.3±2.8
セイヨウキズタ 0.01%	0	101.6±3.6
セイヨウキズタ 0.1%	0	98.2±2.5
セイヨウキズタ 1.0%	0	99.1±2.9
無処理 (対照)	70	49.6±1.8
FBS 0.1% (対照)	70	53.5±2.1
FBS 1.0% (対照)	70	70.3±1.9
セイヨウキズタ 0.01%	70	51.1±1.5
セイヨウキズタ 0.1%	70	58.0±3.2
セイヨウキズタ 1.0%	70	61.3±2.3

【0051】以下に、本発明の処方例を示す。

【処方例1】クリーム

(1) ステアリルアルコール	6.0%
(2) ステアリン酸	2.0%
(3) 水添ラノリン	4.0%
(4) スクワラン	9.0%
(5) オクチルドデカノール	10.0%
(6) POE (25) セチルアルコールエーテル	3.0%

下記の処方（単位は質量％）により、クリームを製造した。



(7) モノステアリン酸グリセリン	2.0%
(8) セイヨウキズタ抽出液	0.1%
(9) 防腐剤	適量
(10) 香料	適量
(11) 1,3ブチレングリコール	6.0%
(12) PEG 1500	4.0%
(13) 精製水	残余

【0052】〔製法〕上記成分(1)～(10)を80℃に加熱溶解し油相とする。成分(11)～(13)を70℃に加熱溶解し水相とする。油相に水相を徐々に加え乳化し、攪拌しながら40℃まで冷却し、さらに30

℃まで攪拌冷却してクリームを得た。

【0053】〔処方例2〕錠剤

下記の処方(単位は質量%)により、錠剤を製造した。

(1) セイヨウキズタ抽出液	20.0%
(2) 乳糖	65.0%
(3) コーンスターチ	14.0%
(4) グアーガム	1.0%

【0054】

【発明の効果】以上に説明したように、特定の植物またはその抽出物を含有する本発明のインテグリン $\alpha 6 \beta 4$ 産生促進剤は、インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ の産生を促進し、ラミニン5と表皮基底細胞の接着を促進することにより、表皮と基底膜の構造維持および機能向上を促す。したがって、老化した皮膚、特に紫外線により障害を受けた皮膚に対して、表皮と基底膜の構造異常および機能低下を予防、防止、改善することにより、しわ、しみ、くすみ、たるみのない若々しい肌の状態を維持することができる。

【0055】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 株式会社ファンケル  
<120> インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ 産生促進用組成物  
<130> PC22-033  
<160> 6

【0056】

<210> 1  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic RNA  
<400> 1  
gaactgtgtg aacatcaga 19

【0057】

<210> 2  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic RNA  
<400> 2

atccttacag catggtatcg 20

【0058】

<210> 3  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic RNA  
<400> 3  
cggatgctgc ttattgagaa c 21

【0059】

<210> 4  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic RNA  
<400> 4  
gagggtggag gatgtgctta g 21

【0060】

<210> 5  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic RNA  
<400> 5  
accacagtcc atgccatcac 20

【0061】

<210> 6  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic RNA

&lt;400&gt; 6

tccaccaccc tgttgctgta 20

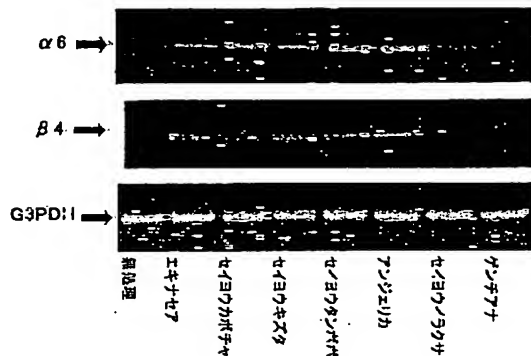
【図面の簡単な説明】

【図1】正常ヒト表皮角化細胞に各植物抽出液を処理し

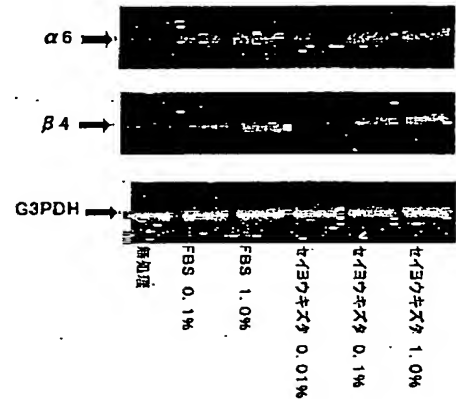
た場合のRT-PCRの結果を示す図である。

【図2】正常ヒト表皮角化細胞にセイヨウキズタの葉の抽出液を濃度依存的に処理した場合のRT-PCRの結果を示す図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

(参考)

A 6 1 K 35/78

A 6 1 K 35/78

T

A 6 1 P 17/00

A 6 1 P 17/00

43/00

1 0 7

43/00

1 0 7

1 1 1

1 1 1

F ターム(参考) 4C083 AA111 AA112 AC022 AC072

AC122 AC182 AC242 AC422

AD042 AD512 CC02 CC05

DD31 EE12

4C088 AB16 AB19 AB26 AB40 AC03

AC04 AC05 AC06 AC08 AC11

AC13 BA07 BA09 BA10 CA03

CA05 CA14 MA07 MA63 NA14

ZA89 ZB22 ZC02

BEST AVAILABLE COPY